



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 09-164000 = CA
127: 106360y
(43) Date of publication of application : 24.06.1997

(51) Int. Cl. C12Q 1/48

(21) Application number : 07-325571 (71) Applicant : NISSHO CORP
(22) Date of filing : 14.12.1995 (73) Inventor : NISHIMUTA SHOTCHI

(54) REAGENT FOR ASSAYING GAMMA-GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE ACTIVITY

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a reagent for accurately assaying the subject activity useful for e.g. hepatopathy diagnosis, by adding a quaternary ammonium salt to a substrate consisting of L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide compound to stabilize the substrate in a solution.

SOLUTION: A quaternary ammonium salt such as an alkyl trimethylammonium salt, alkyl pyridinium salt or halogenated choline is added to a substrate consisting of L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide (salt) so as to be 1mM-2M in the quantity of the quaternary ammonium salt per mM of the substrate to inhibit nonenzymatic decomposition of the substrate and retain its activity in the form of solution, thus obtaining the objective reagent for assaying γ -GTP activity useful for e.g. clinical examinations for hepatopathy because of raising its activity in the liver and serum due to various kinds of hepatopathy.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's
decision of rejection]

[Kind of final disposal of application
other than the examiner's decision of
rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for
application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998, 2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-164000

(43) 公開日 平成9年(1997)6月24日

(51) Int. Cl.⁶
C12Q 1/48

識別記号
7825-4B

F1
C12Q 1/48

特許表示箇所
A

審査請求 未請求 請求項の数2 O L (全5頁)

(21) 出願番号 特願平7-325571

(22) 出願日 平成7年(1995)12月14日

(71) 出願人 000135096
株式会社ニッショー
大阪府大阪市北区本庄西3丁目9番3号
(72) 発明者 西牟田 正一
大阪市北区本庄西3丁目9番3号 株式会社ニッショー内

(54) 【発明の名称】 ェーグルタミルトランスヘプタダーゼ活性測定用試薬

(57) 【要約】

【課題】 溶液状態で基質の活性を失わず、安定したェーグルタミルトランスヘプタダーゼ活性測定用試薬を提供する。

【解決手段】 ェーグルタミルトランスヘプタダーゼ活性測定試薬の非酵素的分解を抑制するため、基質であるL-ェーグルタミル-L-3-カルボキシ-β-ヒドロキシ-α-アミリドまたはその塩の溶液中に第4級アンモニウム塩を含有せらる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 L-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリドまたはその塩を基質として用いる試薬であって、基質に第4級アンモニウム塩を共存させることを特徴とするγ-グルタミルトランスぺプチダーゼ活性測定用試薬。

【請求項2】 基質1mMあたり第4級アンモニウム塩を1mM～2M共存させる請求項1記載のγ-グルタミルトランスぺプチダーゼ活性測定用試薬。

【0001】

【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】本発明は、γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ(γ-glutamyltranspeptidase、以下γ-GTPと略す)活性の測定に関する。より詳しくは、γ-GTP活性の測定において、基質として用いるL-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリドまたはその塩の安定化に関するものである。

【0002】

【従来の技術】γ-GTPは、γ-グルタミルトランスぺプチドを加水分解し、その副産物であるγ-グルタミル基を他のペプチドやL-アミノ酸に転移させる作用を有する酵素である。γ-GTPは、体内に広く分布するが、種々の肝疾患により肝および血清中の活性が上昇することが知られている。

【0003】1995年、日本臨床化学会はγ-GTP活性の測定についての勧告法を公表し、L-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリドがL-γ-グルタミル-p-ニトロアニリドより溶解性に優れていることからγ-GTP活性測定用の基質として承認した。このためγ-GTP活性の測定において、L-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリドを基質として用いることが主流となってくると考えられる。

【0004】γ-GTP測定試薬は、通常、基質であるL-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリドを含む緩衝液と、グリシルグリシン等のアミノ酸またはペプチドを含む緩衝液の2種類の緩衝液(2試薬系)で構成されている。これらの試薬を溶解後、溶液状態で保存する上で問題となるのは、基質であるL-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリドの経時による品質安定性である。L-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリドは、保存中に酵素が存在しなくても分解して(以下これを非酵素的分解と言う。)、3-カルボキシ-4-ニトロアニリンを遊離するという問題がある。この問題を解決する方法として、基質のL-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリドに遷移金属又はその塩を共存させる方法(特開平6-327498号公報)が提案されている。

【0005】しかし、遷移金属はL-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリドを経時的に安定させる効果があるものの、γ-GTP活性を若干阻害する

ため、基質を含まない緩衝液にEDTAなどのキレート剤を添加しておく必要がある。また、遷移金属の銅、ニッケル、亜鉛などは廃液を処理する際に環境上の問題が出てくる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記事情に鑑みてなされたもので、γ-GTP活性の測定に基質として用いるL-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリドの保存中の非酵素的分解を抑制し、経時安定性を高めることを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明はL-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリドまたはその塩を基質として用いるγ-グルタミルトランスぺプチダーゼ活性測定試薬において、第4級アンモニウム塩を基質と共存させることを特徴とするγ-GTP活性測定用試薬を要旨とし、本発明の試薬を用いればL-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリドを用いるγ-GTP活性測定方法において、基質の活性を失うことなく正確な測定ができる。

【0008】本発明で用いる第4級アンモニウム塩としては、例えばアルキルトリメチルアンモニウム塩、アルキルジメチルエチルアンモニウム塩、アルキルジメチルベンジルアンモニウム塩、アルキルピリジニウム塩、アルキルキノリニウム塩、アルキルアミドプロピルジメチルベンジルアンモニウム塩、トリメチキシシリルプロピルジメチルオクタデシルアンモニウム塩、p-イソオクチルフェノキシエトキシエチルジメチルベンジルアンモニウム塩、ハロゲン化コリン、酒石酸水素コリン、クエン酸二水素コリン、グルコン酸コリン、CDPコリン、ホスホリルコリン、アセチルコリンなどが挙げられる。また、これらの第4級アンモニウム塩は単独で使用しても、2種類以上を混合してもよい。

【0009】本発明で用いる第4級アンモニウム塩の使用量は基質1mMあたり1mM～2M添加するのが好ましい。これが1mM以下であると非酵素的な分解を十分に抑制することができず安定性が得られないし、2M以上を添加すると反応の場での陽電荷が大きくなり、γ-GTP活性値に影響を及ぼすため好ましくない。

【0010】本発明における第4級アンモニウム塩の使用により、検体中に存在する陰性に帯電したタンパク質や、陰性のポリマーが第4級アンモニウム塩と結合して測定値に影響を及ぼすような場合には、酵素反応の場に陰イオン界面活性剤を共存させるとよい。ただし、基質と第4級アンモニウム塩を含む緩衝液中に陰イオン界面活性剤を添加すると、第4級アンモニウム塩の作用を妨害する虞れがあるため、アミノ酸またはペプチドを含む緩衝液の方に陰イオン界面活性剤を添加しておくことが好ましい。

【0011】本発明における陰イオン界面活性剤として

は、例えばドデシル硫酸ナトリウム、テトラデシル硫酸ナトリウム、ドデシルスルホン酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウムまたはこれらの塩などが挙げられる。

【0012】本発明における陰イオン界面活性剤の添加濃度としては第4級アンモニウム塩1mMに対し、1mM～2M添加するのが好ましい。これが1mM以下であると影響を回避することができず、2M以上であると、過剰な陰イオン界面活性剤と陽性に帯電したタンパク質が結合して濁りを起こすなど、測定値への影響が出るた

・CuSO ₄	6mM
・NiCl ₂	6mM
・臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム	1%
・ヒドロキシプロピル-β-D-シクロデキストリン	1%

レーダーグルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリドを精製水で溶解し、6mMに調整したものに上記4種類の添加剤をそれぞれ既知濃度添加した。また比較として精製水で調整を行った後、無添加のものについての測定を行った。各基質調整液のpHは添加剤の有無に係わらず、pH4に調整されている。これら調整済みの5種の溶液をバイアル瓶に封入し、分光光度計405nm

め好ましくない。

【0013】

【発明の実施の形態】以下実施例により本発明をさらに詳細に述べる。

【実施例1】レーダーグルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質の酵素的分解の抑制効果の検討を行うため、下記に示す添加剤を用いて加速によるシミュレーション試験を行った。下記の添加剤において数値は基質調整液6mMに対する添加濃度を表す。

mにおける吸光度をそれぞれ測定した。その後加速によるシミュレーションとして温度25℃の恒温槽中で28日間静置保存し、各基質調整液について波長405nmにして分光光度計で経時変化を測定した。この結果を表1に示す。

【0014】

【表1】

添加剤	経過日数				ΔABS*
	0	7	14	21	
精製水溶解（無添加）	0.7623	1.3210	2.2512	3.2315	2.9876
6mM CuSO ₄	0.7761	0.9831	1.5125	1.4551	0.9790
6mM NiCl ₂	0.7971	0.9081	1.5213	1.4322	0.9351
1% 臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム	0.8324	0.9110	1.5029	1.4242	0.5918
2-ヒドロキシプロピル-β-D-シクロデキストリン	0.7574	1.2524	1.5021	2.1021	1.4424

*温度=25℃、測定値=測定波長405nmでの吸光度

*ΔABS=21日目測定吸光度-0日目測定吸光度

【0015】表1より分るように精製水溶解液は調整直後から21日目までの吸光度変化はΔABS 2.4590であったのに対し、第4級アンモニウム塩の臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウムはΔABS 0.5918であり、基質の非酵素的分解を抑制する効果が最も優れていた。

【0016】【実施例2】次に実施例1で基質の非酵素的分解を抑制する効果のみられた第4級アンモニウム塩について更に詳細な検討を加えるため、下記に示す第4

級アンモニウム塩を用いて、実施例1と同様な方法でレーダーグルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリドの基質の分解抑制効果の検討を行った。この結果を表2に示す。検討した添加剤は表2の通りであり、それに付した数値は基質調整液6mMに対する添加濃度を表す。

【0017】

【表2】

添加剤	経過日数			ABS ^{*1}	相対比 ^{*2}
	0	7	14		
精製水(無添加)	0.8169	1.0289	1.2758	1.0589	1.0000
5mM CuSO ₄	0.8373	0.9055	1.2962	0.4529	0.4277
0.5% 臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム塩	0.8228	0.9758	1.1031	0.2792	0.2638
1.0% 臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム塩	0.8247	0.9860	1.0440	0.2193	0.2071
3.0% 臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム塩	0.8764	0.9757	1.1009	0.3245	0.2120
0.5% 臭化テトラデシルトリメチルアンモニウム塩	0.8308	0.9647	1.1588	0.3280	0.3098
1.0% 臭化テトラデシルトリメチルアンモニウム塩	0.8360	0.9531	1.1023	0.2663	0.2515
3.0% 臭化テトラデシルトリメチルアンモニウム塩	0.8193	0.9167	1.0196	0.2905	0.2893
0.5% 臭化オクタデシルトリメチルアンモニウム塩	0.8404	0.9978	1.2257	0.3853	0.3639
1.0% 臭化オクタデシルトリメチルアンモニウム塩	0.8328	0.9840	1.2068	0.3740	0.3532
3.0% 臭化オクタデシルトリメチルアンモニウム塩	0.8214	0.9735	1.1783	0.3569	0.3370
0.5% 重酒石酸コリン	0.8192	1.0213	1.3985	0.5793	0.5471
1.0% 重酒石酸コリン	0.8324	0.9110	1.4657	0.6393	0.5981
2.0% 重酒石酸コリン	0.8354	1.0867	1.5093	0.6739	0.6364
5.0% 重酒石酸コリン	0.8565	1.2325	1.5975	0.7410	0.6998
0.5% 塩化コリン	0.8510	0.9903	1.3043	0.4731	0.4468
1.0% 塩化コリン	0.8274	0.9863	1.3009	0.4785	0.4472
2.0% 塩化コリン	0.8355	0.9788	1.3009	0.4654	0.4395
5.0% 塩化コリン	0.8401	0.9383	1.2521	0.4120	0.3891

*温度＝25℃、測定値＝測定波長495nmでの吸光度

*¹△ABS＝14日目測定吸光度－0日目測定吸光度

*²相対比＝精製水△ABSを1とした時の各△ABSの比

【0018】 25℃で4日間、1%のアルコール溶液中に2%以上にすれば、基質の非酵素的分解を抑制するために3-カルボキシー-4-ニトロアニリド基質の加速によるシミュレーション試験を行った結果、第4級アンモニウム塩のアルキル基の炭素鎖が長くなるにつれて、基質の非酵素的分解を抑制する効果があった。特に臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(C₁₆)が効果的であった。しかし、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム溶液は冷蔵保存(10℃前後)により溶解度が低下し、濁りが発生した。よって冷蔵保存を考えた場合、第4級アンモニウム塩のアルキル基の炭素鎖はC₁₆未満が適当である。また、炭素鎖の短い塩化コリンでも添加濃度を

添加剤：0.5～2% 臭化テトラデシルトリメチルアンモニウム
0.5～2% 重酒石酸コリン
0.5～2% 塩化コリン

血清5μlに第1試薬170μlを加え、37℃で5分間あらかじめ加温後、第2試薬88μlを加え攪拌し、405nm(主波長)と700nm(副波長)における単位時間当たりの吸光度の増加を測定した。同時に活性値が既知であるγ-GTPの吸光度の増加を測定し、こ

にCu塩と同等以上の効果が確認できた。

【0019】(実施例3)実施例2で検討した第4級アンモニウム塩がγ-GTP活性値の測定に及ぼす影響について検討した。なお、試薬組成は下記に示す通りである。

(第1試薬)
230mM グリシルグリシン緩衝液 pH7.9
(第2試薬)
18mM レーザーグルタミル-3-カルボキシー-4-ニトロアニリド

の値から血清のγ-GTP活性を決定した。測定は、自動分析装置(日立 7150)で行った。この結果を表3に示す。

【0020】
【表3】

添加剤	臭化テトラデシルトリメチルアンモニウム		
添加濃度(%)	0	1	2
血清① (IU)	26.2	18.5	24.5
血清② (IU)	72.3	38.1	52.4
添加剤	重酒石酸コリン		
添加濃度(%)	0	1	2
血清① (IU)	26.2	24.5	24.5
血清② (IU)	72.3	73.1	68.4
添加剤	塩化コリン		
添加濃度(%)	0	1	2
血清① (IU)	26.2	24.5	25.2
血清② (IU)	72.3	73.5	73.1

【0021】重酒石酸コリンおよび塩化コリンなどのコリン塩を添加したものは、添加濃度に係わらず、血清のγ-GTP活性値に影響は見られなかった。一方、臭化テトラデシルトリメチルアンモニウムを試薬に添加したものは若干活性値が低下した。この活性値の低下は水溶液中で陽性に帯電した第4級アンモニウム塩が、検体中の陰性に帯電したタンパク質や陰性のポリマーと結合したことによるものと考えられる。

【0022】〔実施例4〕実施例3における第4級アンモニウム塩のγ-GTP活性値への影響を回避するため、陰イオン界面活性剤を添加して検討を行った。

(第1試薬)

23.0mM グリシルグリシン緩衝液 pH7.9

添加物：0.5～2% コール酸ナトリウム

(第2試薬)

18mM L-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド

添加剤：0.5～2% 臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム

上記に示す通り第1試薬に陰イオン界面活性剤添加して試薬を調整し、実施例3と同様な操作によってγ-GTP活性値を測定した。この結果を表4に示す。

【0023】

【表4】

コール酸ナトリウム(%)	0	0.5	1	2
臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(%)	0	2	2	2
血清① (IU)	26.2	29.5	27.5	25.8
血清② (IU)	141.3	150.3	145.2	142.2

【0024】第2試薬に添加された第4級アンモニウム塩と同濃度の陰イオン界面活性剤を第1試薬に添加することで活性値への影響を回避することが可能になった。

【0025】

【発明の効果】本発明のように、基質のL-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリドに第4級アンモニウム塩を共存させることで、溶液状態で保存中に基質が非酵素的に分解することを効果的に抑制するこ

とができる。そして第4級アンモニウム塩は従来の添加剤に比べ経済的にも安価であり、しかも毒性が比較的小さいことから廃液などの処理を考えた場合にも有利である。また、酵素反応の場陰イオン界面活性剤を共存させることで、第4級アンモニウム塩の添加による測定値への影響を完全に回避することができるため、精度の高い試薬を提供することが可能である。